

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-118287

(43)Date of publication of application : 09.05.1995

(51)Int.Cl.

C07H 15/26
C07H 17/065
C09K 15/08
C12P 19/58

(21)Application number : 05-338083

(71)Applicant : C C I KK

(22)Date of filing : 28.12.1993

(72)Inventor : MURASE HIRONORI
KUNIEDA TSUTOMU
TSUJII TETSUYA

(30)Priority

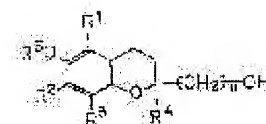
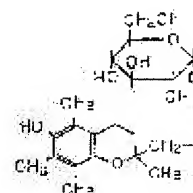
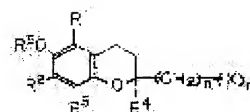
Priority number : 05 23026
05221490Priority date : 10.02.1993
06.09.1993Priority country : JP
JP

(54) NEW CHROMANOL GLUCOSIDE AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a new chromanol glucoside acting as an extremely effective antioxidant in aqueous solution, having excellent thermal and pH stability and useful as a raw material for cosmetics, clothes, foods, etc.

CONSTITUTION: A new chromanol glucoside is expressed by the formula I [R1, R2, R3 and R4 are H or lower alkyl; R5 is H, lower alkyl or lower acyl; X is monosaccharide residue or oligosaccharide residue; (n) is integer of 0-4; (m) is integer of 1-6], e.g. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-methyl- α -D-glucopyranoside of the formula II. The compound of the formula I can be produced by reacting a 2-substituted-alcohol of the formula III with an oligosaccharide, soluble starch, starch or cyclodextrin in the presence of an enzyme catalyzing the corresponding sugar rearrangement action.



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-118287

(43)公開日 平成7年(1995)5月9日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 15/26				
17/065				
C 0 9 K 15/08				
C 1 2 P 19/58		7432-4B		

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 27 頁)

(21)出願番号	特願平5-338083	(71)出願人	000106771 シーシーアイ株式会社 岐阜県羽島郡岐南町八剣7丁目148番地
(22)出願日	平成5年(1993)12月28日	(72)発明者	村瀬 博宣 岐阜県岐阜市長良2435番地の178
(31)優先権主張番号	特願平5-23026	(72)発明者	国枝 勉 岐阜県揖斐郡池田町青柳128番地の5
(32)優先日	平5(1993)2月10日	(72)発明者	辻井 哲也 愛知県名古屋市中村区稲葉地町8-85
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(74)代理人	弁理士 八田 幹雄
(31)優先権主張番号	特願平5-221490		
(32)優先日	平5(1993)9月6日		
(33)優先権主張国	日本 (J P)		

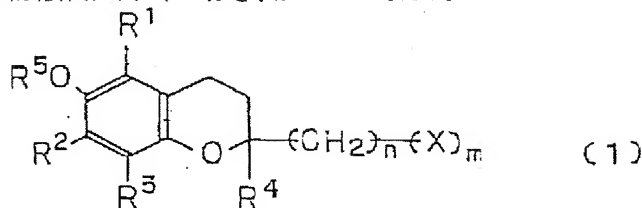
(54)【発明の名称】 新規なクロマノール配糖体およびその製造方法

(57)【要約】

*を提供する。

【目的】 熱およびpH安定性に優れた水溶性の抗酸化
 剤である新規なクロマノール配糖体およびその製造方法*

【構成】 一般式(1)
 【化1】



(ただし、式中、 R^1 , R^2 , R^3 および R^4 は同一または異なる水素原子または低級アルキル基、 R^5 は水素原子、低級アルキル基または低級アシル基、Xは単糖残基またはオリゴ糖残基であり、糖残基の水酸基の水素原

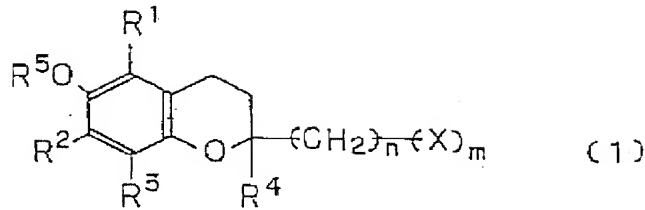
子は低級アルキル基または低級アシル基で置換されていてもよく、nは0~4の整数を表わし、またmは1~6の整数を表わす)で表わされるクロマノール配糖体。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一般式 (1)

* 【化 1】

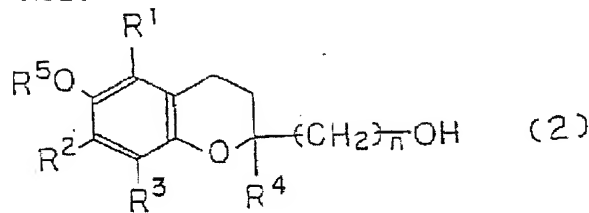
*



(ただし、式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は同一または異なる水素原子または低級アルキル基、 R^5 は水素原子、低級アルキル基または低級アシル基、 X は単糖残基またはオリゴ糖残基であり、糖残基の水酸基の水素原子は低級アルキル基または低級アシル基で置換されていてもよく、 n は 0~4 の整数を表わし、また m は 1~6 の整数を表わす) で表わされるクロマノール配糖体。

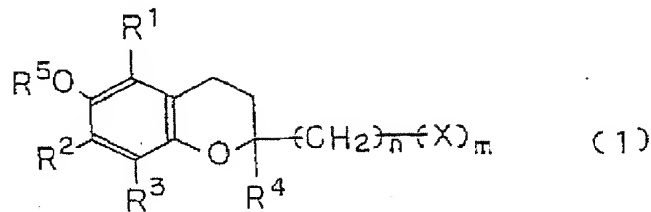
【請求項 2】 一般式 (2)

【化 2】



20

※

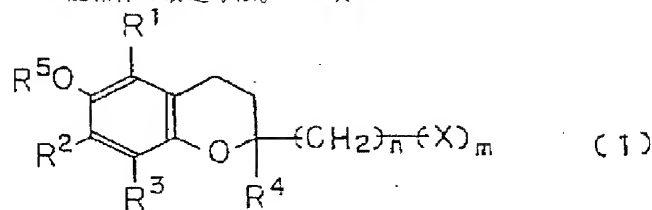


(但し、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 X および n は前記定義のとおりであり、また m は 1~6 の整数である) で表わされるクロマノール配糖体の製造方法。

★

★ 【請求項 3】 一般式 (1)

【化 4】



(ただし、式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は同一または異なる水素原子または低級アルキル基、 R^5 は水素原子、低級アルキル基または低級アシル基、 X は単糖残基またはオリゴ糖残基であり、糖残基の水酸基の水素原子は低級アルキル基または低級アシル基で置換されていてもよく、 n は 0~4 の整数を表わし、また m は 1~6 の整数を表わす) で表わされるクロマノール配糖体を有

効成分とする抗酸化剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なクロマノール配糖体およびその製造方法に関するものである。詳しく述べると、2-置換アルコールに糖を結合させることによる化学的安定性に優れた新規な水溶性抗酸化剤およびそ

の製造方法に関するものである。

【0002】

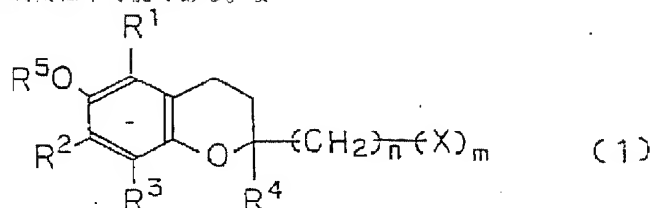
【従来の技術】古くより過酸化脂質の生成は食品などの品質劣化の原因として知られていたが、最近では生体においても動脈硬化、老化、癌など様々な疾病に関連していることが明らかになってきている。そこで、活性酸素などによって引き起こされる過酸化脂質の生成を抑えるための抗酸化剤の開発は、食品ばかりではなく化粧品、医薬品など多くの分野において注目を集めている。

【0003】天然に存在する抗酸化剤としてはトコフェロール類、没食子酸、アスコルビン酸、グルタチオン、 β -カロテンなどが知られており、また食品に添加して油脂の酸化を防止する目的で合成されたブチルヒドロキシアニソールやブチルヒドロキシトルエンなども抗酸化剤として知られている。

【0004】これら抗酸化剤のなかにおいて、特にトコフェロール類のその優れた抗酸化活性は注目を集め、食品、化粧品、医薬品分野において多用されている。また、トコフェロールの優れた抗酸化活性はクロマン環に起因していることより、トコフェロールの2位のイソプレノイド側鎖をカルボキシル基に置換した6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸（以下、トロロックス）等は商品として知られており、また、その他にも2-置換アルコール等が知られている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、トコフェロール類は、水に不溶性粘性油状物のため注射剤または内服液等の溶液剤としての利用は不可能である。ま *



【0010】（ただし、式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は同一または異なる水素原子または低級アルキル基、 R^5 は水素原子、低級アルキル基または低級アシル基、 X は単糖残基またはオリゴ糖残基であり、糖残基の水酸基の水素原子は低級アルキル基または低級アシル基で置換されていてよく、 n は0~4の整数を表わし、また m は1~6の整数を表わす）で表わされるクロマン-2-配糖体により達成される。

【0011】上記目的は、一般式（2）

【0012】

【化6】

*た、トロロックス、2-置換アルコールも水に対する溶解性は非常に低い。

【0006】これら化合物を水溶性にするためには

（a）界面活性剤の添加、（b）シクロデキストリンによる包括、（c）水溶性化合物を用いた化学修飾（エステル化）等の方法が考えられるが、（a）および（b）の場合には、かなりの量の界面活性剤またはシクロデキストリンが必要となり、本来不用品の多量の混入が問題となる。また、これらの方法では十分な水溶性が得られていないのが現状である（特開昭61-21184号、特開昭62-281855号、特開昭62-226975号、特開昭60-116643号、特公昭41-5118号等）。また、（c）の方法の6位のフェノール性水酸基を水溶性化合物で修飾する方法では、抗酸化活性を著しく減少させることになる。また、別の問題として、トコフェロールおよびクロマン環をもつ化合物等は熱およびアルカリなどに対して不安定であるなどの欠点も持っている。

【0007】したがって、本発明の目的は、優れた抗酸化活性を有するクロマン環を利用して溶液剤としても使用可能で、かつ化学的安定性にも優れた新規な水溶性抗酸化剤であるクロマン-2-配糖体およびその製造方法を提供することにある。

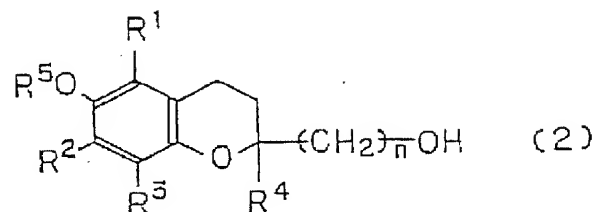
【0008】

【課題を解決するための手段】上記目的は、一般式

（1）

【0009】

【化5】



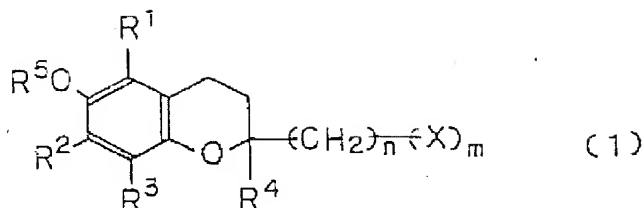
【0013】（ただし、式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は同一または異なる水素原子または低級アルキル基、 R^5 は水素原子、低級アルキル基または低級アシル基を表わし、また n は0~4の整数を表わす）で表わされる2-置換アルコールと、オリゴ糖類、可溶性澱粉、澱粉またはシクロデキストリンを、相当する糖転位作用を触媒する酵素の存在下に反応させることを特徴とする

一般式 (1)

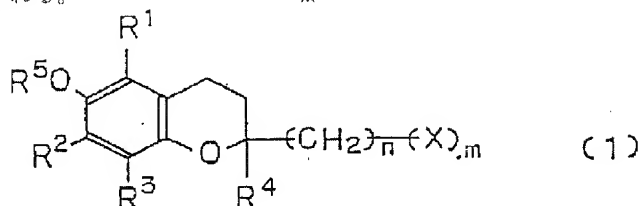
【0014】

* 【化7】

*



【0015】 (ただし、 $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5$, Xおよびnは前記定義のとおりであり、またmは 10
1~6の整数である) で表わされるクロマノール配糖体 【0016】 上記目的は、一般式 (1)
の製造方法によっても達成される。 ※ 【0017】 【化8】



【0018】 (ただし、式中、 $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ および R^4 は同一または異なる水素原子または低級アルキル基、 R^5 は水素原子、低級アルキル基または低級アシル基、Xは単糖残基またはオリゴ糖残基であり、糖残基の水酸基の水素原子は低級アルキル基または低級アシル基で置換されていてもよく、nは0~4の整数を表わし、またmは1~6の整数を表わす) で表わされるクロマノール配糖体を有効成分とする抗酸化剤によっても達成される。

【0019】 一般的に、配糖化された物質は配糖化前の物に比べると、(1) 水に対する溶解度の向上、(2) 化学的な安定性の向上、(3) 味質、生理活性の改変、増大が可能など様々な利点が挙げられており、配糖化が生理活性物質などの性状、物性を高める有用な手段の一つであると考えられている。本発明者らは、クロマン環を保持した水溶性抗酸化剤を開発するため、2-置換アルコール (一般式 (2)) の2-位の水酸基に糖を結合させた全く知られていない新規な配糖体 (一般式 (1)) を考え出した。

【0020】

【作用】 本発明に用いる2-置換アルコール (一般式 (2)) は公知の物質であり、特公平1-43755号、特公平1-49135号等の方法により、得ることができる。また2-置換アルコール (一般式 (2))、 $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{CH}_3$ 、 $\text{R}^5 = \text{H}$ 、 $n = 1$) はトロロックスを水素化リチウムアルミニウムの存在下においてジエチルエーテル中で加熱還流処理することなどにより容易に得ることができる。

【0021】 この配糖体の合成を行うことに当たって、2-置換アルコール (一般式 (2)) の2-位の水酸基に対してのみ特異的に糖の特定の水酸基を結合させるこ

とは化学的合成法では困難である。本発明者らは酵素を用いることにより、非常に効率よく目的のクロマノール配糖体 (一般式 (1)) を簡単に合成させうる方法を発見した。そして得られた新規なクロマノール配糖体の水溶性、安定性の著しい向上また水溶性抗酸化剤としての優れた活性を確認し本研究を完成するに至った。

【0022】 酵素としては反応に用いる糖の種類によって使い分けることが好ましい。

【0023】 (1) 2-置換アルコールに α 結合でグルコース残基を結合させる場合

(a) マルトースからマルトテトラオース位のマルトオリゴ糖に対しては α -グルコシダーゼ (α -glucosidase, EC 3.2.1.20) を作用させることが望ましい。 α -グルコシダーゼとしては、ほぼ全ての起源由来のものを用いることができ、例えば、東洋紡株式会社製のサッカロマイセス属 (*Saccharomyces* sp.) 由来の α -グルコシダーゼ、オリエンタル酵母工業株式会社製のサッカロマイセス セロビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の α -グルコシダーゼ、天野製薬株式会社製のアスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) 由来の α -グルコシダーゼ、和光純薬工業株式会社製のサッカロマイセス属 (*Saccharomyces* sp.) 由来の α -グルコシダーゼ、シグマ (SIGMA) 製のベーカリーイースト (*Bakers yeast*) 由来の α -グルコシダーゼ、バチルス (*Bacillus*) 属由来の α -グルコシダーゼ等が挙げられる。

【0024】 (b) 可溶性澱粉、澱粉に対しては4- α -グルカノトランスフェラーゼ (4- α -D-glucanotransferase, EC 2.4.1.

25) を作用させることが望ましい。

【0025】(2) 2-置換アルコールに α 結合でグルコース残基またはマルトオリゴ糖残基を結合させる場合マルトオリゴ糖、可溶性澱粉、澱粉またはシクロデキストリン(α 、 β 、 γ)などに対してはシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(cyclodextrin glucanotransferase, EC 2.4.1.19)を作用させることが望ましい。例えば、天野製薬株式会社製のバチルスマセランス(Bacillus macerans)由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、株式会社林原生物化学研究所製のバチルス ステアロサーモフィラス(Bacillus stearothermophilus)由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、その他にはバチルス メガテリウム(Bacillus megaterium)、バチルスサーキュランス ATCC 9995(Bacillus circulans ATCC 9995)由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼなどが挙げられる。

【0026】(3) 2-置換アルコールに β 結合でグルコース残基を結合させる場合

(a) セロビオース、カードラン、ラミナランなどの β 結合よりなるオリゴ糖に対しては β -グルコシダーゼ(β -glucosidase, EC 3.2.1.21)を作用させることが望ましい。

【0027】(b) リン酸存在下のセロビオースに対してはセロビオース ホスホリラーゼ(cellobiose phosphorylase, EC 2.4.1.20)を作用させることが望ましい。

【0028】(4) 2-置換アルコールに α 結合でガラクトース残基を結合させる場合

(a) メリビオース、ラフィノースなどに対しては α -ガラクトシダーゼ(α -galactosidase, EC 3.2.1.22)を作用させることが望ましい。

【0029】(5) 2-置換アルコールに β 結合でガラクトース残基を結合させる場合

(a) ラクトースなどに対しては β -ガラクトシダーゼ(β -galactosidase, EC 3.2.1.23)を作用させることが望ましい。

【0030】(b) アラビノガラクトタンなどに対してはエンドー1, 4- β -ガラクタナーゼ(Endo-1, 4- β -galactanase, EC 3.2.1.89)を作用させることが望ましい。

【0031】(6) 2-置換アルコールに β 結合でフラクトース残基を結合させる場合

(a) ショ糖、ラフィノース、メリビオースなどに対してはレバンシュークラーゼ(levansucrase, EC 2.4.1.10)を作用させることが望

ましい。

【0032】(b) ショ糖に対しては β -フルクトフラノシダーゼ(β -fructofuranosidase, EC 3.2.1.26)を作用させることが望ましい。

【0033】(c) イヌリンなどに対してはイヌリンフルクトトランスフェラーゼ(inulin fructotransferase, EC 2.4.1.93)を作用させることが望ましい。

- 10 【0034】クロマノール配糖体(一般式(1)、 $m=1$)を α -グルコシダーゼを用いて合成する場合の反応条件としては、2-置換アルコール(一般式(2))を糖溶液に溶解させることが望ましい。そのためには有機溶媒の添加が望ましく、例えば、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド、メタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリルなどが挙げられ、 α -グルコシダーゼの転移活性を高めるためにはジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミドが好ましい。添加する有機溶媒の濃度は1~50(v/v)%、
- 20 好ましくは反応効率を考えると5~35(v/v)%である。

【0035】2-置換アルコール(一般式(2))の濃度は、反応液中において飽和濃度もしくはそれに近い濃度にするのが望ましい。用いる糖の種類はマルトースからマルトテトラオース位の低分子のものが良く、好ましくはマルトースである。糖の濃度は1~70(w/v)%、好ましくは30~60(w/v)%である。pHは4.5~7.5、好ましくは5.0~6.5である。反応温度は10~70℃、好ましくは30~60℃である。反応時間は1~40時間、好ましくは2~24時間である。但し、これらの条件は使用する酵素量により影響をうける。反応終了後、反応液をXAD(オルガノ株式会社)を担体として用いたカラムクロマトグラフィーで処理することにより、高純度のクロマノール配糖体(一般式(1)、 $m=1$)が得られる。

- 30 【0036】クロマノール配糖体(一般式(1)、 $m=1$)をシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを用いて合成する場合の反応条件としては、2-置換アルコール(一般式(2))を糖溶液に溶解させることが望ましい。そのためには有機溶媒の添加が望ましく、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド、メタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリルなどが挙げられる。添加する有機溶媒の濃度は1~50(v/v)%、好ましくは反応効率を考えると5~35(v/v)%である。2-置換アルコール(一般式(2))の濃度は反応液中において、飽和濃度もしくはそれに近い濃度にするのが望ましい。

- 50 【0037】用いる糖の種類はマルトトリオース以上の重合度を持つマルトオリゴ糖、可溶性澱粉、澱粉およびシクロデキストリン(α 、 β 、 γ)などが好ましい。糖

の濃度は1~70 (w/v) %、好ましくは5~50 (w/v) %である。pHは4.5~8.5、好ましくは5.0~7.5である。反応温度は10~70℃、好ましくは30~60℃である。反応時間は1~60時間、好ましくは2~50時間である。但し、これらの条件は使用する酵素量により影響をうける。

【0038】この反応により生じるクロマノール配糖体(一般式(1))はmの数が1から8位の混合物となる。そこで、この混合物をグルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3)処理することで、クロマノール配糖体(一般式(1))のmが1のものだけを得ることが出来る。この時の反応温度は20~70℃、好ましくは30~60℃、反応時間は0.1~40時間、好ましくは1~24時間である。但し、これらの条件は使用する酵素の量により影響をうける。そしてこのグルコアミラーゼ処理後の液を、XAD(オルガノ株式会社)を担体として用いたカラムクロマトグラフィー処理することにより、高純度のクロマノール配糖体(一般式(1)、m=1)が得られる。

【0039】クロマノール配糖体(一般式(1)、m=2)を得る場合は上記条件により、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼによって得られるクロマノール配糖体(一般式(1)、mが1から8位の混合物)にβ-アミラーゼ(EC 3.2.1.2)を作用させることにより、クロマノール配糖体(一般式(1))のmが1と2のものだけを得ることが出来る。この時の反応温度は20~70℃、好ましくは30~60℃、反応時間は0.1~40時間、好ましくは1~24時間である。但し、これらの条件は使用する酵素量により影響をうける。そしてこのβ-アミラーゼ処理後の液を、XAD(オルガノ株式会社)を担体として用いたカラムクロマトグラフィー処理することにより、高純度のクロマノール配糖体(一般式(1)、m=2)が得られ、また同時にクロマノール配糖体(一般式(1)、m=1)も得られる。

【0040】クロマノール配糖体(一般式(1)、mが3以上)を得る場合は上記条件により、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼによって得られるクロマノール配糖体(一般式(1)、mが1から8位の混合物)を、HPLCを用いた分取クロマトグラフィーなどで処理することにより、高純度の各m数のクロマノール配糖体(一般式(1))を得ることが出来る。

【0041】このようにして得られたクロマノール配糖体の水に対する溶解度はトロロクセス、2-置換アルコールに比べ著しく高いものとなり、注射剤または内服液などの溶剤としての利用が可能となった。また、該クロマノール配糖体の熱安定性およびpH安定性はトコフェロール、トロロクセス、2-置換アルコールらに比べ明らかに向上した。

【0042】抗酸化活性を評価するためヘキサノーイソ

プロピルアルコール溶液中における高度不飽和脂肪酸メチルエステルの過酸化速度を測定したところ、トコフェロールと同等の結果を生じた。また生体膜をモデルとして卵黄レシチンでリボソームをつくり、水溶性ラジカル発生剤でリボソームの外側より酸化反応を促進させた際、リボソームの外側にクロマノール配糖体を存在させておくことで、酸化速度を抑えることができた。そしてこの結果は水溶性の抗酸化剤として知られるアスコルビン酸などに比べて、顕著に酸化速度を抑えていることが判った。また、クロマノール配糖体はクロマン環を持っていることにより、一重項酸素など様々な活性酸素の消去能をも有していることは明らかである。

【0043】

【実施例】次に実施例により本発明を説明するが、これらにより本発明の範囲がなんら制限されるものでないことは言うまでもない。

【0044】参考例1

α-グルコシダーゼ(α-glucosidase, EC 3.2.1.20)の活性測定法
4 (w/v) %マルトース水溶液100 μlに100 mMリン酸緩衝液(pH 6.5) 300 μlを加え、37℃で5分間インキュベートした後、酵素液40 μlを加え、同温度条件下において20分間反応させ5分間の煮沸処理により反応を停止させた。そして生成したグルコースをグルコース測定キット(和光純薬工業株式会社製)を用い測定した。なお、1 Uは上記条件において1分間に1 μmolのマルトースの加水分解を触媒する酵素量とした。

【0045】参考例2

シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(cyclodextrin glucanotransferase, EC 2.4.1.19)の活性測定法
50 mM酢酸緩衝液(pH 6.0)で調整した0.55 (W/V) %可溶性澱粉(Merck社, No. 1257)溶液250 μlを、40℃で5分間インキュベートした後、酵素液50 μlを加え、同温度条件下において10分間反応させ、0.5 M酢酸溶液を1 ml添加することにより反応を停止させた。

【0046】そして、0.02 (w/v) %I₂/0.2 (w/v) %KI溶液を1 ml、水を2 ml加え吸光度700 nmを測定することにより、可溶性澱粉の分解率を測定した。なお、1 Uは上記条件において1分間に10%の吸光度(700 nm)を減少させる酵素量とした。

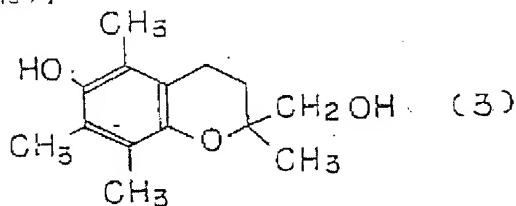
【0047】実施例1

50 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)で調整した60 (w/v) %マルトース溶液80 mlに対し、ジメチルスルホキシドで調整した5 (w/v) %の式(3)で示されるRS-2-置換アルコール溶液16 mlおよび400 Uの東洋紡株式会社製のサッカロマイセス属(Sa

c. charomyces sp.) 由来の α -グルコシダーゼを加え、40℃において20時間反応させた。このときの2-置換アルコールのクロマノール配糖体への転換率はモル比で約45%であった。この反応液を30%メタノール溶液で平衡化したXAD-4(オルガノ株式会社製)カラムにアプライし、非吸着物を30%メタノール溶液で溶出後、80%メタノール溶液でクロマノール配糖体を溶出させた。次に得られたクロマノール配糖体画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:メタノール, 5:1, v/v)処理することで高純度のクロマノール配糖体:式(4)で示される6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシドを約300mg得た。

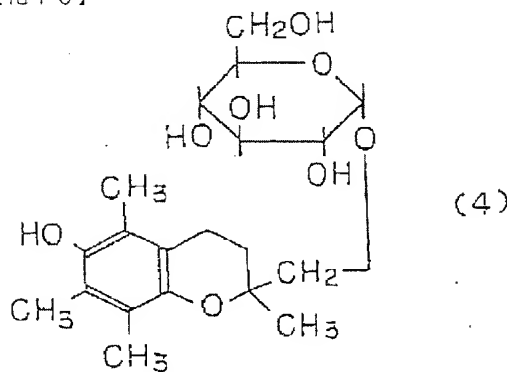
【0048】

【化9】



【0049】

【化10】



【0050】この化合物の赤外吸収スペクトルを図1に示す。

【0051】本化合物の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, * 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} = +85 \pm 1^\circ$ (C=0.5、エタノール)

【0054】実施例2

50mM酢酸緩衝液(pH6.0)で調整した10(w/v)% α -サイクロデキストリン溶液80mlに対し、ジメチルスルホキシドで調整した5(w/v)%の前記式(3)で示されるRS-2-置換アルコール溶液16mlおよび19000Uの株式会社林原生物化学研究所製のバチルス・ステアロサーモフィラス(*Bacillus stearothermophilus*)由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを

* 質量分析および比旋光度の結果を示す。

【0052】

$^1\text{H-NMR}$ δ (270MHz, DMSO- d_6)

1.23および1.25(s, 3H)

1.69から1.75(m, 1H)

1.87から1.92(m, 1H)

1.97(s, 3H)

2.02(s, 3H)

2.04(s, 3H)

10 2.51(broad t, 2H)

3.05から4.88(m, 13H)

7.39(s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (67.8MHz, DMSO- d_6 , プロトンデカップリングスペクトル)

11.7

11.7

12.6

19.7および19.8

22.2および22.4

20 28.2

60.6および60.8

70.0および70.1

71.2および71.5

71.9

72.6および72.9

73.1

73.8および73.9

98.7および98.8

116.6および116.7

30 120.1および120.2

120.7および120.8

122.5

144.2

145.1

質量スペクトル(FAB)

m/z 398 (分子イオンピーク)

【0053】

【外1】

加え、50℃において43時間反応させた。この時のRS-2-置換アルコールのクロマノール配糖体への転換率はモル比で約95%であり、この反応液中のクロマノール配糖体は、糖の結合数が1から8位の混合物であった。この反応液を15分間煮沸処理することにより、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを失活させ、400Uの東洋紡株式会社製のリゾプス属(*Rhizopus* sp.)由来のグルコアミラーゼを添加し、50℃において5時間反応させることにより、反応

液中のクロマノール配糖体の約95%以上を糖の結合数が1のものに変換した。この反応液を10分間煮沸処理することにより、グルコアミラーゼを失活させた後、30%メタノール溶液で平衡化したXAD-4（オルガノ株式会社製）カラムにアプライし、非吸着物を30%メタノールで溶出後、80%メタノール溶液でクロマノール配糖体を溶出させた。次に得られたクロマノール配糖体画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール、5：1、v/v）処理することで高純度のクロマノール配糖体：前記式（4）で示される6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシドを約1100mg得た。

【0055】この化合物の赤外性吸収スペクトルを図2に示す。

【0056】本化合物の $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、質量分析および比旋光度の結果を示す。

【0057】

$^1\text{H-NMR}$ δ (270MHz, DMSO- d_6)

1.23および1.25 (s, 3H)

1.69から1.76 (m, 1H)

1.88から1.93 (m, 1H)

1.97 (s, 3H)

2.02 (s, 3H)

2.04 (s, 3H)

2.51 (broad t, 2H)

3.06から4.88 (m, 13H)

比旋光度

$[\alpha]_D^{25} = +82 \pm 1^\circ$ (C=0.5、エタノール)

【0059】実施例3

50mM酢酸緩衝液(pH6.0)で調整した10(w/v)% α -サイクロデキストリン溶液120mlに対し、ジメチルスルホキシドで調整した5(w/v)%の前記式(3)で示されるRS-2-置換アルコール溶液24mlおよび150000Uの天野製薬株式会社製のバチルス・マセランス(*Bacillus macerans*)由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを加え、50℃において43時間反応させた。この時のRS-2-置換アルコールのクロマノール配糖体への転換率はモル比で約55%であり、この反応液中のクロマノール配糖体は、糖の結合数が1から8位の混合物であった。この反応液を15分間煮沸処理することにより、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを失活させ、600Uの東洋紡株式会社製のリゾプス属(*Rhizopus* sp.)由来のグルコアミラーゼを添加し、50℃において5時間反応させることにより、反応液中のクロマノール配糖体の約95%以上を糖の結合数が1のものに変換した。この反応液を10分間煮沸処理することにより、グルコアミラーゼを失活さ

* 7.39 (s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (67.8MHz, DMSO- d_6 、プロトンデカップリングスペクトル)

11.7

11.7

12.6

19.7および19.9

22.2および22.4

28.3

10 60.6および60.8

70.0および70.1

71.1および71.4

71.9

72.6および72.9

73.1

73.8および73.9

98.8

116.6および116.7

120.2

20 120.8

122.5

144.2

145.1

質量スペクトル(FAB)

m/z 398 (分子イオンピーク)

【0058】

* 【外2】

せた後、30%メタノール溶液で平衡化したXAD-4（オルガノ株式会社製）カラムにアプライし、非吸着物を30%メタノールで溶出後、80%メタノール溶液でクロマノール配糖体を溶出させた。次に得られたクロマノール配糖体画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール、5：1、v/v）処理することで高純度のクロマノール配糖体：前記式（4）で示される6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシドを約950mg得た。

【0060】この化合物の赤外吸収スペクトルを図3に示す。

【0061】本化合物の $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、質量分析および比旋光度の結果を示す。

【0062】

$^1\text{H-NMR}$ δ (270MHz, DMSO- d_6)

1.23および1.25 (s, 3H)

1.69から1.78 (m, 1H)

1.91から1.93 (m, 1H)

50 1.97 (s, 3H)

2.02 (s, 3H)
 2.04 (s, 3H)
 2.51 (broad t, 2H)
 3.07から4.88 (m, 13H)
 7.40 (s, 1H)
¹³C-NMR δ (67.8MHz, DMSO-
 d₆, プロトンデカップリングスペクトル)
 11.7
 11.7
 12.6
 19.9
 22.3
 28.2
 60.6
 69.9
 71.1

比旋光度

$[\alpha]_D^{25} = +80 \pm 1^\circ$ (C=0.5、エタノール)

【0064】実施例4

50mM酢酸緩衝液(pH6.0)で調整した10(w/v)% α -サイクロデキストリン溶液80mlに対し、ジメチルスルホキシドで調整した5(w/v)%の前記式(3)で示されるRS-2-置換アルコール溶液16mlおよび19000Uの株式会社林原生物化学研究所製のバチルス ステアロサーモフィラス(*Bacillus stearothermophilus*)由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを加え、50℃において43時間反応させた。この時のRS-2-置換アルコールのクロマノール配糖体への転換率はモル比で約95%であり、この反応液中のクロマノール配糖体は、糖の結合数が1から8位の混合物であった。この反応液を15分間煮沸処理することにより、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを失活させ、70mlの100mM酢酸緩衝液(pH5.0)を加えた。そして2500Uのシグマ(SIGMA CHEMICAL CO.)製Type I-Bのスイートポテト由来の β -アミラーゼを添加し、50℃において4時間反応させることにより、反応液中のクロマノール配糖体の約98%以上を糖の結合数が1と2のものに変換した。この反応液を10分間煮沸処理することにより、

* 71.9
 72.6
 73.0および73.1
 73.8
 98.8
 116.6および116.7
 120.2
 120.8および120.9
 122.5
 10 144.2
 145.1
 質量スペクトル(FAB)
 m/z 398 (分子イオンピーク)
 【0063】
 【外3】

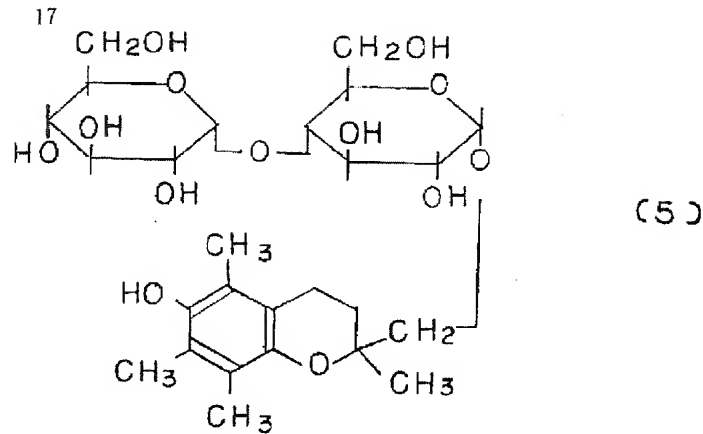
*

20 β -アミラーゼを失活させた後、30%メタノール溶液で平衡化したXAD-4(オルガノ株式会社製)カラムにアブライし、非吸着物を30%メタノールで溶出後、80%メタノール溶液でクロマノール配糖体を溶出させた。次に得られたクロマノール配糖体画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:メタノール、5:1、v/v)処理することで高純度のクロマノール配糖体:前記式(4)で示される6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシドを約520mg、式(5)で示される6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-マルトピラノシドを約610mg得た。

【0065】得られた前記式(4)で示される6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシドの赤外線吸収スペクトルは図2と同一であり、また¹H-NMR, ¹³C-NMR, 質量分析および比旋光度の結果は実施例2と同一であった。

【0066】

40 【化11】



【0067】得られた前記式(5)で示される6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-マルトピラノシドの赤外吸収スペクトルを図4に示す。

【0068】本化合物の $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、質量分析および比旋光度の結果を示す。

【0069】

$^1\text{H-NMR}$ δ (270MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 20

1.22および1.25 (s, 3H)

1.69から1.74 (m, 1H)

1.89 (m, 1H)

1.97 (s, 3H)

2.01 (s, 3H)

2.04 (s, 3H)

2.51 (broad t, 2H)

3.09から5.43 (m, 23H)

7.39 (s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (67.8MHz, $\text{DMSO}-d_6$, プロトンデカップリングスペクトル) 30

11.7

11.7

12.6

19.7および19.8

21.8および22.3

28.1および28.5

\times 59.7および60.2

60.7

69.7

70.6および70.7

71.0

71.5

72.4および72.5

72.8および72.9

73.2

73.3

73.7および73.9

79.8

98.4および98.6

100.8および100.9

116.6

120.1および120.2

120.9

122.6

144.1および144.2

145.2

質量スペクトル (FAB)

m/z 560 (分子イオンピーク)

【0070】

【外4】

比旋光度

$[\alpha]_D^{25} = +111 \pm 1^\circ$ (C=0.5、エタノール)

【0071】実施例5

50mM酢酸緩衝液 (pH6.0) で調整した10 (w/v) % α -サイクロデキストリン溶液120mlに対し、ジメチルスルホキシドで調整した5 (w/v) % の前記式(3)で示されるRS-2-置換アルコール溶液24mlおよび150000Uの天野製薬株式会社製のバチルス マセランス (*Bacillus macerans*) 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを加え、50℃において43時間反応させた。この時のRS-2-置換アルコールのクロマノール配糖

体への転換率はモル比で約55%であり、この反応液中のクロマノール配糖体は、糖の結合数が1から8位の混合物であった。この反応液を15分間煮沸処理することにより、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを失活させ、100mlの100mM酢酸緩衝液 (pH5.0) を加えた。そして4000Uのシグマ (SIGMA CHEMICAL CO.) 製Type I-Bのスイートポテト由来の β -アミラーゼを添加し、50℃において4時間反応させることにより、反応液中のクロマノール配糖体の約98%以上を糖の結合数が1と2

のものに変換した。この反応液を10分間煮沸処理することにより、 β -アミラーゼを失活させた後、30%メタノール溶液で平衡化したXAD-4（オルガノ株式会社製）カラムにアブライし、非吸着物を30%メタノールで溶出後、80%メタノール溶液でクロマノール配糖体を溶出させた。次に得られたクロマノール配糖体画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール、5：1、v/v）処理することで高純度のクロマノール配糖体：前記式（4）で示される6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシドを約450mg、前記式（5）で示される6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-マルトピラノシドを約440mg得た。

【0072】得られた前記式（4）で示される6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシドの赤外吸収スペクトルは図3と同一であり、また $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、質量分析および比旋光度の結果は実施例3と同一であった。

【0073】得られた前記式（5）で示される6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-マルトピラノシドの赤外吸収スペクトルを図5に示す。

【0074】本化合物の $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、質量分析および比旋光度の結果を示す。

【0075】

$^1\text{H-NMR}$ δ (270MHz, DMSO- d_6)

1.22および1.26 (s, 3H)

1.75 (m, 1H)

1.89 (m, 1H)

1.97 (s, 3H)

2.02 (s, 3H)

2.03 (s, 3H)

2.50 (broad t, 2H)

比旋光度

$[\alpha]_D^{25} = +113 \pm 1^\circ$ (C=0.5、エタノール)

【0077】実施例6

50mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で調整した60 (w/v) % マルトース溶液90mlに対し、ジメチルスルホキシドで調整した2.5 (w/v) % の式（6）で示されるRS-2-置換アルコール溶液30mlおよび400Uの東洋紡株式会社製のサッカロマイセス属 (*Saccharomyces* sp.) 由来の α -グルコシダーゼを加え、40℃において20時間反応させた。このときの2-置換アルコールのクロマノール配糖体への転換率はモル比で約55%であった。この反応液を30%メタノール溶液で平衡化したXAD-4（オルガノ株式会社製）カラムにアブライし、非吸着物を30

* 3.09から5.43 (m, 23H)

7.39 (s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (67.8MHz, DMSO- d_6 、プロトンデカップリングスペクトル)

11.7

11.7

12.6

19.8

21.8および22.3

10 28.5

59.7

60.7

69.7

70.6および70.7

71.0

71.4

72.5

72.9

73.2

20 73.3

73.7および73.9

79.8

98.4および98.6

100.8および100.9

116.6

120.1および120.2

120.8

122.6

144.1

30 145.1

質量スペクトル (FAB)

m/z 560 (分子イオンピーク)

【0076】

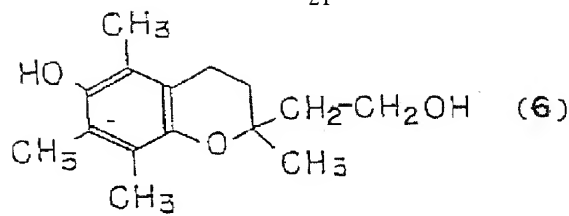
【外5】

*

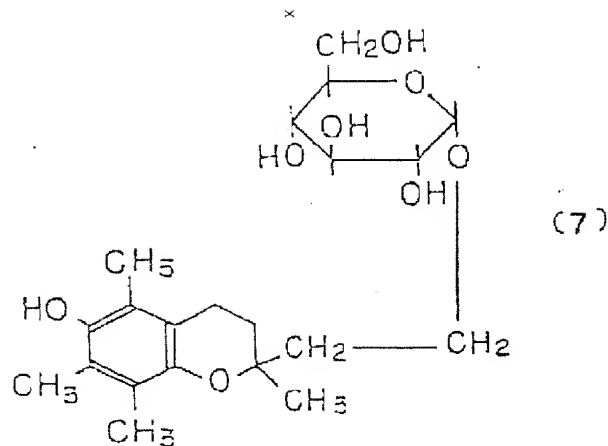
%メタノール溶液で溶出後、80%メタノール溶液でクロマノール配糖体を溶出させた。次に得られたクロマノール配糖体画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール、7：1、v/v）処理することで高純度のクロマノール配糖体：式（7）で示される6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-グルコピラノシドを約550mg得た。

【0078】

【化12】



* 【0079】
【化13】



【0080】この化合物の赤外吸収スペクトルを図6に示す。

【0081】本化合物の¹H-NMR、¹³C-NMR、質量分析および比旋光度の結果を示す。

【0082】¹H-NMR δ (270MHz、DMSO-d₆)

1.21および1.22 (s, 3H)

1.76から1.81 (m, 4H)

1.98 (s, 3H)

2.02 (s, 3H)

2.05 (s, 3H)

2.51 (broad t, 2H)

3.03から4.89 (m, 13H)

7.39 (s, 1H)

¹³C-NMR δ (67.8MHz、DMSO-d₆、プロトンデカップリングスペクトル)

11.6

11.7

12.7

20.1

24.0および24.1

20※ 31.5および31.6

37.9および38.0

60.7および60.8

62.9および63.0

70.1および70.2

71.8

72.7および72.8

73.0および73.1

73.2

98.6および98.7

30 116.6

120.3

120.9

122.5

144.1

145.1

質量スペクトル (FAB)

m/z 412 (分子イオンピーク)

【0083】

【外6】

※40

比旋光度

[α]_D²⁵ = +85 ± 1° (C = 0.5、エタノール)

【0084】実施例7

50mM酢酸緩衝液 (pH6.0) で調整した10 (w/v) % α-サイクロデキストリン溶液120mlに対し、ジメチルスルホキシドで調整した2.5 (w/v) % の式(6)で示されるRS-2-置換アルコール溶液40mlおよび20000Uの株式会社林原生物化学研究所製のバチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus*

stearothermophilus) 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを加え、50℃において43時間反応させた。この時のRS-2-置換アルコールのクロマノール配糖体への転換率はモル比で約35%であり、この反応液中のクロマノール配糖体は、糖の結合数が1から8位の混合物であった。この反応液を15分間煮沸処理することにより、シ

クロデキストリングルカノトランスフェラーゼを失活させ、600Uの東洋紡株式会社製のリゾプス属 (Rhizopus sp.) 由来のグルコアミラーゼを添加し、50℃において5時間反応させることにより、反応液中のクロマノール配糖体の約95%以上を糖の結合数が1のものに変換した。この反応液を10分間煮沸処理することにより、グルコアミラーゼを失活させた後、30%メタノール溶液で平衡化したXAD-4 (オルガノ株式会社製) カラムにアプライし、非吸着物を30%メタノールで溶出後、80%メタノール溶液でクロマノール配糖体を溶出させた。次に得られたクロマノール配糖体画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:メタノール、7:1、v/v) 処理することで高純度のクロマノール配糖体:前記式(7)で示される6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-グルコピラノシドを約390mg得た。

【0085】この化合物の赤外吸収スペクトルを図7に示す。

【0086】本化合物の¹H-NMR, ¹³C-NMR, 質量分析および比旋光度の結果を示す。

【0087】

¹H-NMR δ (270MHz, DMSO-d₆)

1.22 (s, 3H)

1.76から1.81 (m, 4H)

1.98 (s, 3H)

2.01 (s, 3H)

2.05 (s, 3H)

2.51 (broad t, 2H)

比旋光度

$[\alpha]_D^{25} = +89 \pm 1^\circ$ (C=0.5、エタノール)

【0089】実施例8

50mM酢酸緩衝液 (pH6.0) で調整した10 (w/v) % α -サイクロデキストリン溶液120mlに対し、ジメチルスルホキシドで調整した2.5 (w/v) %の前記式(6)で示されるRS-2-置換アルコール溶液40mlおよび20000Uの株式会社林原生物化学研究所製のバチルス stearothermophilus 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを加え、50℃において43時間反応させた。この時のRS-2-置換アルコールのクロマノール配糖体への転換率はモル比で約35%であり、この反応液中のクロマノール配糖体は、糖の結合数が1から8位の混合物であった。この反応液を15分間煮沸処理することにより、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを失活させ、110mlの100mM酢酸緩衝液 (pH5.0) 加えた。そして6000Uのシグマ (SIGMA CHEMICAL CO.) 製Type B-1の

* 3.06から4.86 (m, 13H)

7.38 (s, 1H)

¹³C-NMR δ (67.8MHz, DMSO-d₆、プロトンデカップリングスペクトル)

11.6

11.7

12.6

20.1

24.0および24.1

10 31.5および31.6

37.9および38.0

60.7および60.8

62.9および63.0

70.1

71.8

72.7および72.8

73.0および73.1

73.2

98.6および98.7

20 116.6

120.2

120.9

122.5

144.1

145.1

質量スペクトル (FAB)

m/z 412 (分子イオンピーク)

【0088】

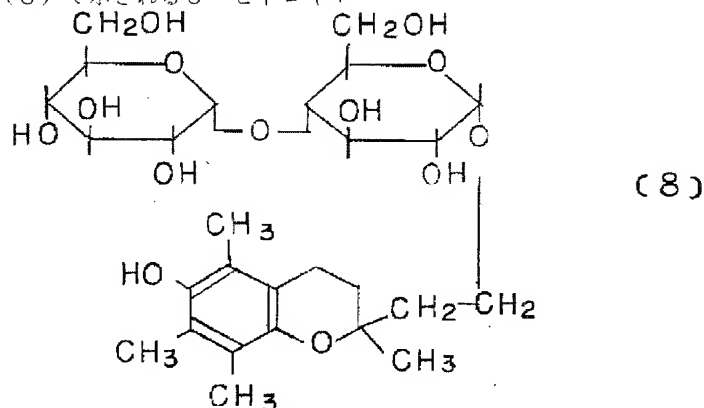
【外7】

イートポテト由来の β -アミラーゼを添加し、50℃において4時間反応させることにより、反応液中のクロマノール配糖体の約98%以上を糖の結合数が1と2のものに変換した。この反応液を10分間煮沸処理することにより、 β -アミラーゼを失活させた後、30%メタノール溶液で平衡化したXAD-4 (オルガノ株式会社製) カラムにアプライし、非吸着物を30%メタノールで溶出後、80%メタノール溶液でクロマノール配糖体を溶出させた。次に得られたクロマノール配糖体画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:メタノール、7:1、v/v) 処理することで高純度のクロマノール配糖体:前記式(7)で示される6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-グルコピラノシドを約170mg、式(8)で示される6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-マルトピラノシドを約200mg得た。

50 【0090】得られた前記式(7)で示される6-ヒド

ロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-グルコピラノシドの赤外線吸収スペクトルは図7と同一であり、また¹H-NMR, ¹³C-NMR, 質量分析および比旋光度の結果は実施例7と同一であった。

【0091】得られた式(8)で示される6-ヒドロキ*



【0093】本化合物の¹H-NMR, ¹³C-NMR, 質量分析および比旋光度の結果を示す。

【0094】

¹H-NMR δ (270MHz, DMSO-d₆)

1.21 (s, 3H)

1.78から1.85 (m, 4H)

1.98 (s, 3H)

2.01 (s, 3H)

2.05 (s, 3H)

2.50 (broad t, 2H)

3.06から5.41 (m, 23H)

7.38 (s, 1H)

¹³C-NMR δ (67.8MHz, DMSO-d₆, プロトンデカップリングスペクトル)

11.6

11.7

12.6

20.1

23.8および24.1

31.5

37.9および38.0

60.2

60.7

*シ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-マルトピラノシドの赤外線吸収スペクトルを図8に示す。

【0092】

【化14】

※ 63.1

20 69.8

70.9

71.0

71.4

72.5

73.0

73.0

73.2および73.3

79.8

98.4

30 100.8

116.6

120.3

120.9

122.5

144.1

145.1

質量スペクトル (FAB)

m/z 574 (分子イオンピーク)

【0095】

40 【外8】

※

比旋光度

$[\alpha]_D^{25} = +119 \pm 1^\circ$ (C=0.5, エタノール)

【0096】実施例9

実施例1~5によって得られたクロマノール配糖体(前記式(4))、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシド、実施例6~8によって得られたクロマノール配糖体(前記式(7))、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-

テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-グルコピラノシド、実施例4~5によって得られたクロマノール配糖体(前記式(5))、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-マルトピラノシド)および実施例8によって得られたクロマノール配糖体(前記式(8))、6-ヒドロキシ-

2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-マルトピラノシド)の抗酸化活性をリノール酸メチルのラジカル連鎖自動連鎖反応の抑制により評価した。132 μ molのリノール酸メチル、16.5 μ molの脂溶性ラジカル発生剤(2, 2'-アゾビス(2, 4-ジメチルバレロニトリル))、0.1 μ molのクロマノール配糖体、ブチルヒドロキシルエーまたは α -トコフェロールからなるヘキサン/イソプロピルアルコール(1:1, v/v)溶液1.1mlを37℃でインキュベートし、経時的にサンプリングし、高速液体クロマトグラフィーでリノール酸メチルヒドロパーオキシドの生成量を測定した。図9および図10に示すように、クロマノール配糖体前記式(4)、前記式(5)、前記式(7)および前記式(8)の有機溶媒中における抗酸化活性はブチルヒドロキシルエーより優れており、また α -トコフェロールと同等であることが判る。

【0097】実施例10

実施例1~5によって得られたクロマノール配糖体(前記式(4)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシド)、実施例6~8によって得られたクロマノール配糖体(前記式(7)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-グルコピラノシド)、実施例4~5によって得られたクロマノール配糖体(前記式(5)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-マルトピラノシド)および実施例8によって得られたクロマノール配糖体(前記式(8)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-マルトピラノシド)の抗酸化活性を多重層リボソームのラジカル連鎖自動酸化反応の抑制により評価した。5.5 μ molの卵黄ホスファチジルコリンの多重層リボソーム、16.5 μ molの水溶性ラジカル発生剤(2, 2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)二塩酸塩)、0.1 μ molのクロマノール配糖体またはア

スכולビン酸からなる反応液を10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)1.1mlで調整後、37℃でインキュベートし、経時的にサンプリングし、高速液体クロマトグラフィーでホスファチジルコリンヒドロパーオキシドの生成量を測定した。図11および図12に示すように、クロマノール配糖体前記式(4)、前記式(5)、前記式(7)および前記式(8)は水溶性の抗酸化剤であるアスכולビン酸より、明らかに効果的な抗酸化剤であることが判る。

【0098】実施例11

実施例1~5によって得られたクロマノール配糖体(前記式(4)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシド)、実施例6~8によって得られたクロマノール配糖体(前記式(7)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-グルコピラノシド)、実施例4~5によって得られたクロマノール配糖体(前記式(5)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-マルトピラノシド)および実施例8によって得られたクロマノール配糖体(前記式(8)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-マルトピラノシド)の熱に対する安定性を評価した。5mMのクロマノール配糖体溶液(水/エタノール、1:3, v/v)を各温度条件でインキュベートし、所定時間でサンプリングし、残存量を高速液体クロマトグラフィーで測定した。比較として前記式(3)および前記式(6)で示される2-置換アルコールおよび α -トコフェロール、トロロックスも同様に評価した。

【0099】表1および表2に100時間後の残存率の結果を示す。これらの表により2-置換アルコールを配糖体化することによる熱安定性の向上が認められた。

【0100】

【表1】

	温度 (℃)	100時間後の 残存率 (%)
実施例 1	50	99
クロマノール配糖体	60	98
式 (4)	70	72
実施例 2	50	98
クロマノール配糖体	60	96
式 (4)	70	71
実施例 3	50	98
クロマノール配糖体	60	96
式 (4)	70	73
実施例 4	50	98
クロマノール配糖体	60	95
式 (4)	70	71
実施例 5	50	99
クロマノール配糖体	60	96
式 (4)	70	72
実施例 6	50	96
クロマノール配糖体	60	90
式 (7)	70	57
実施例 7	50	97
クロマノール配糖体	60	90
式 (7)	70	59
実施例 8	50	97
クロマノール配糖体	60	91
式 (7)	70	59

	温度 (°C)	100時間後の 残存率 (%)
実施例4	50	98
クロマノール配糖体	60	98
式(5)	70	71
実施例5	50	98
クロマノール配糖体	60	98
式(5)	70	81
実施例8	50	97
クロマノール配糖体	60	93
式(8)	70	71
2-置換アルコール	50	89
式(3)	60	86
	70	60
2-置換アルコール	50	92
式(6)	60	89
	70	62
トロロックス	50	90
	60	82
	70	25
α -トコフェロール	50	85
	60	79
	70	30

【0102】実施例12

実施例1～5によって得られたクロマノール配糖体（前記式(4)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシド）、実施例6～8によって得られたクロマノール配糖体（前記式(7)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-グルコピラノシド）、実施例4～5によって得られたクロマノール配糖体（前記式(5)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-マルトピラノシド）および実施例8によって得られたク
40 ロマノール配糖体（前記式(8)、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-マルトピラノシド）の各pHに対する安定性を

30 評価した。各pHの5.5mMのクロマノール配糖体溶液（緩衝液/エタノール、5:1、v/v）を40℃でインキュベートし、所定時間でサンプリングし、残存量を高速液体クロマトグラフィーで測定した。比較として前記式(3)および前記式(6)で示される2-置換アルコールおよびトロロックスも同様に評価した。

【0103】表3および4に100時間後の残存率の結果を示す。これらの表により2-置換アルコールを配糖体化することによるpH安定性の向上が認められた。なお、用いた緩衝液はpH5.5:100mM酢酸緩衝液、pH7.0:100mMリン酸緩衝液、pH8.5:100mMトリス-塩酸緩衝液である。

【0104】

【表3】

	p H	100時間後の 残存率 (%)
実施例 1	5.5	91
クロマノール配糖体	7.0	41
式 (4)	8.5	20
実施例 2	5.5	85
クロマノール配糖体	7.0	42
式 (4)	8.5	19
実施例 3	5.5	89
クロマノール配糖体	7.0	43
式 (4)	8.5	20
実施例 4	5.5	84
クロマノール配糖体	7.0	44
式 (4)	8.5	19
実施例 5	5.5	88
クロマノール配糖体	7.0	43
式 (4)	8.5	21
実施例 6	5.5	69
クロマノール配糖体	7.0	24
式 (7)	8.5	7
実施例 7	5.5	71
クロマノール配糖体	7.0	26
式 (7)	8.5	7
実施例 8	5.5	70
クロマノール配糖体	7.0	25
式 (7)	8.5	8

	pH	100時間後の 残存率(%)
実施例4	5.5	84
クロマノール配糖体	7.0	40
式(5)	8.5	19
実施例5	5.5	86
クロマノール配糖体	7.0	44
式(5)	8.5	20
実施例8	5.5	57
クロマノール配糖体	7.0	16
式(8)	8.5	2
2-置換アルコール	5.5	73
式(3)	7.0	29
	8.5	7
2-置換アルコール	5.5	63
式(6)	7.0	19
	8.5	3
トロロックス	5.5	75
	7.0	35
	8.5	13

【0106】実施例13

実施例1～5によって得られたクロマノール配糖体（前記式(4)、6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-グルコピラノシド）、実施例6～8によって得られたクロマノール配糖体（前記式(7)、6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-グルコピラノシド）、実施例4～5によって得られたクロマノール配糖体（前記式(5)、6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-メチル- α -D-マルトピラノシド）および実施例8によって得られたクロマノール配糖体（前記式(8)、6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-エチル- α -D-マルトピラノシド）の水に対する溶解度を評価

した。過剰量のクロマノール配糖体を水1mlに加え、25℃でインキュベートし、20時間攪拌（200rpm）後、サンプレップCO2-LG（ミリポア社製）に液を移し、遠心分離（4100×g、10分、20℃）することにより不溶物を除去し、得られた水溶液中のクロマノール配糖体の溶解量を高速液体クロマトグラフィーで測定した。比較として前記式(3)および前記式(6)で示される2-置換アルコールおよびトロロックス同様に評価した。

【0107】表5および6に示すようにクロマノール配糖体の優れた水に対する溶解性が明らかになった。表中の値は1mlの水に溶解した量を示す。

【0108】

【表5】

	mg/ml
実施例 1 クロマノール配糖体 式 (4)	約 1000
実施例 2 クロマノール配糖体 式 (4)	約 1000
実施例 3 クロマノール配糖体 式 (4)	約 1000
実施例 4 クロマノール配糖体 式 (4)	約 1000
実施例 5 クロマノール配糖体 式 (4)	約 1000
実施例 6 クロマノール配糖体 式 (7)	33
実施例 7 クロマノール配糖体 式 (7)	45
実施例 8 クロマノール配糖体 式 (7)	45

39	40
	mg/ml
実施例 4 クロマノール配糖体 式 (5)	1000 以上
実施例 5 クロマノール配糖体 式 (5)	1000 以上
実施例 8 クロマノール配糖体 式 (8)	141
2-置換アルコール 式 (3)	1
2-置換アルコール 式 (6)	0.1
トロロックス	0.2

【0110】

【発明の効果】本発明による新規クロマノール配糖体およびその製造方法は、前記のとおりであるから新規であるばかりではなく、特に水溶液中において非常に有効な新規な抗酸化剤であり、また優れた熱および pH 安定性により、化粧品、衣料品、食品、化成品などの原料として非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】は、本発明によるクロマノール配糖体の実施例 1 における赤外線吸収スペクトルである。

【図 2】は、本発明によるクロマノール配糖体の実施例 2 における赤外線吸収スペクトルである。

【図 3】は、本発明によるクロマノール配糖体の実施例 3 における赤外線吸収スペクトルである。

【図 4】は、本発明によるクロマノール配糖体の実施例 4 における赤外線吸収スペクトルである。

【図 5】は、本発明によるクロマノール配糖体の実施例 5 における赤外線吸収スペクトルである。

【図 6】は、本発明によるクロマノール配糖体の実施例 6 における赤外線吸収スペクトルである。

【図 7】は、本発明によるクロマノール配糖体の実施例 7 における赤外線吸収スペクトルである。

【図 8】は、本発明によるクロマノール配糖体の実施例 8 における赤外線吸収スペクトルである。

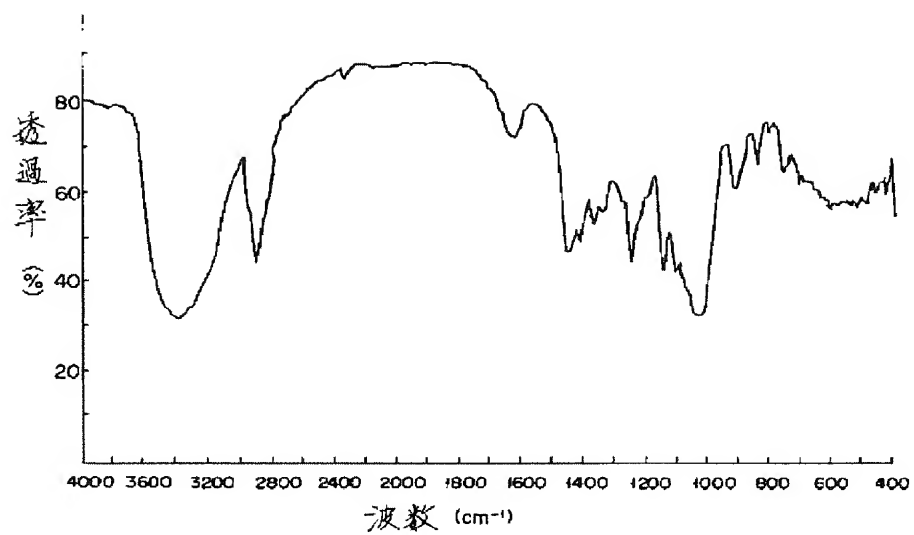
【図 9】は、本発明によるクロマノール配糖体の抗酸化活性を示すグラフである。

【図 10】は、本発明によるクロマノール配糖体の抗酸化活性を示すグラフである。

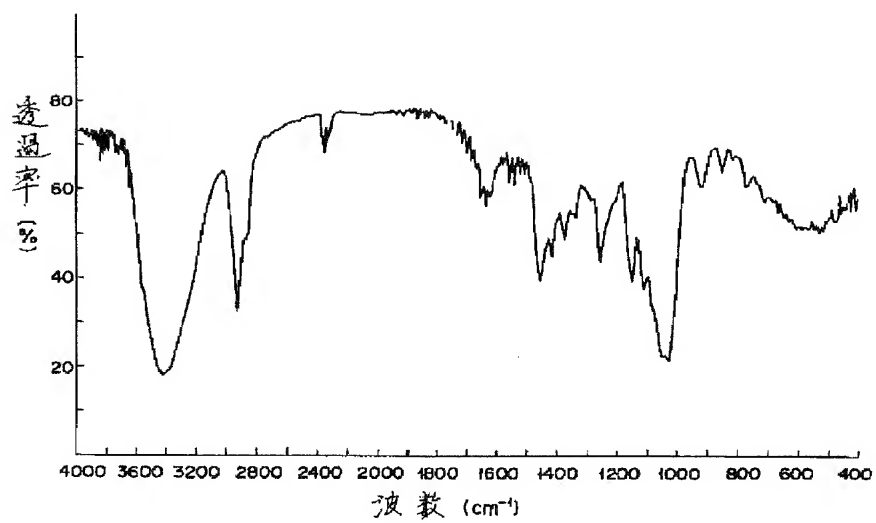
【図 11】は、本発明によるクロマノール配糖体の抗酸化活性を示すグラフである。

【図 12】は、本発明によるクロマノール配糖体の抗酸化活性を示すグラフである。

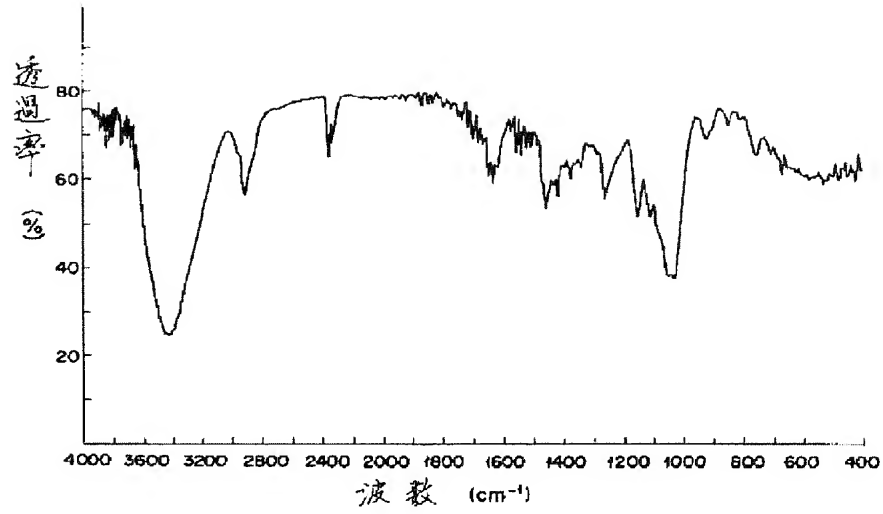
【図1】



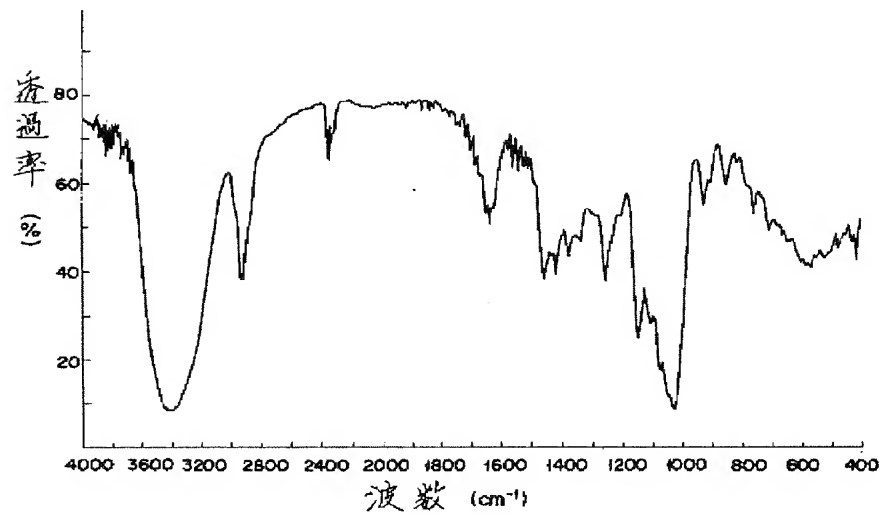
【図2】



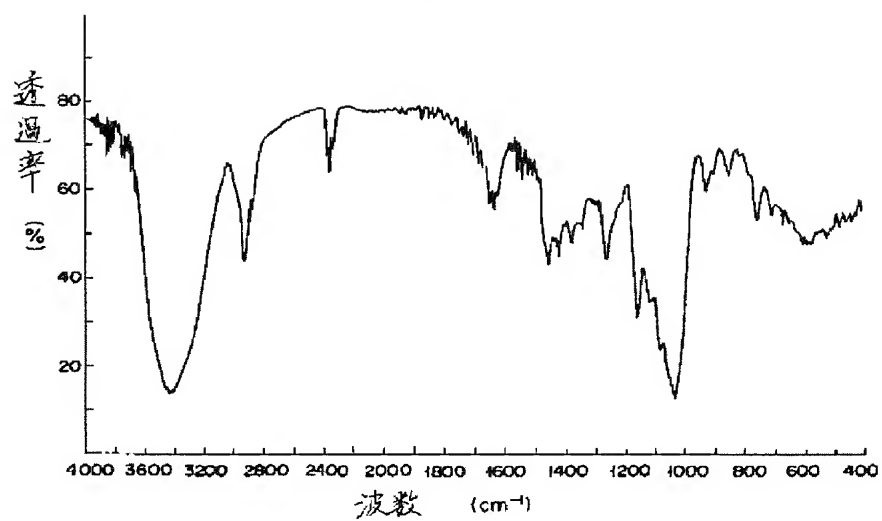
【図 3】



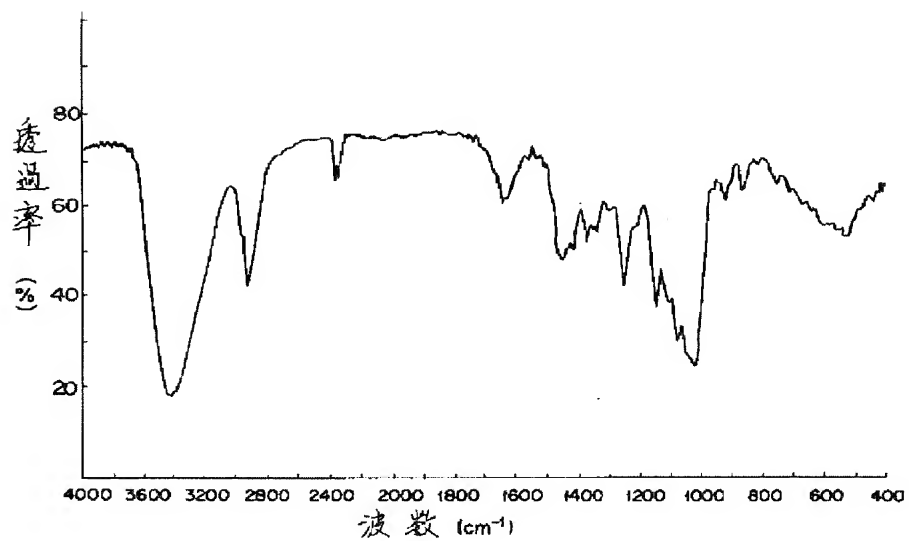
【図 4】



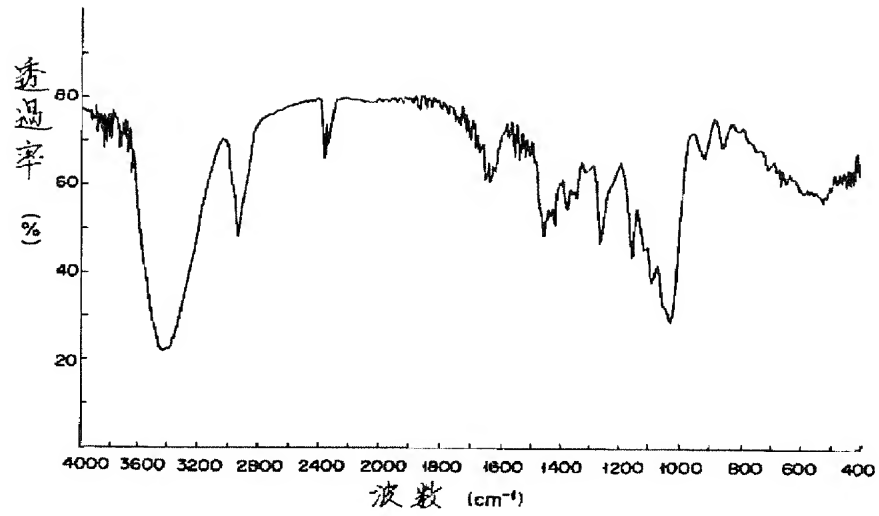
【図 5】



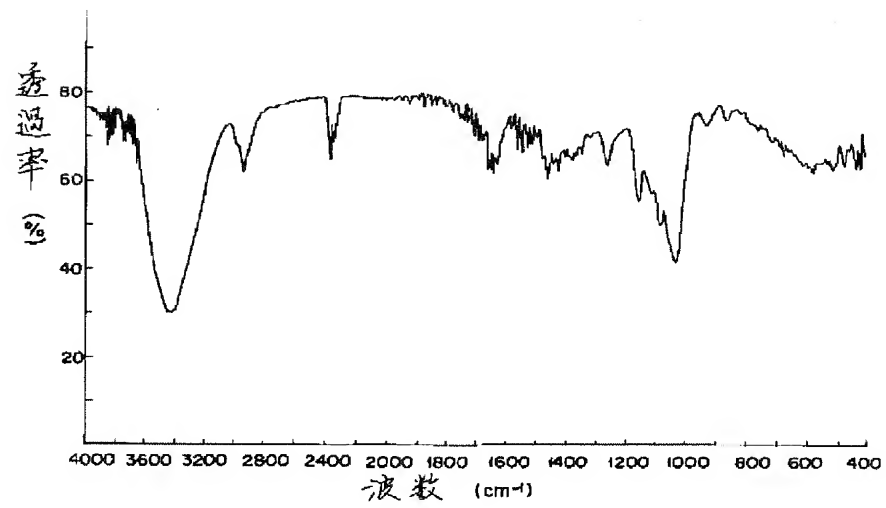
【図 6】



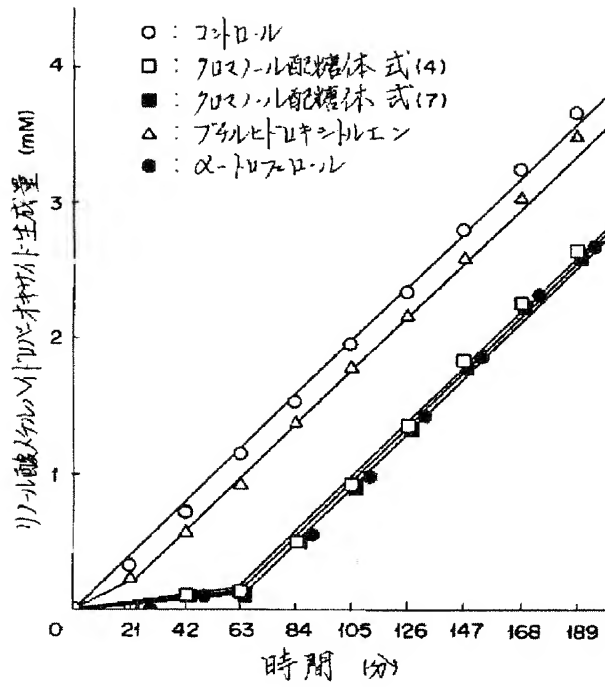
【図7】



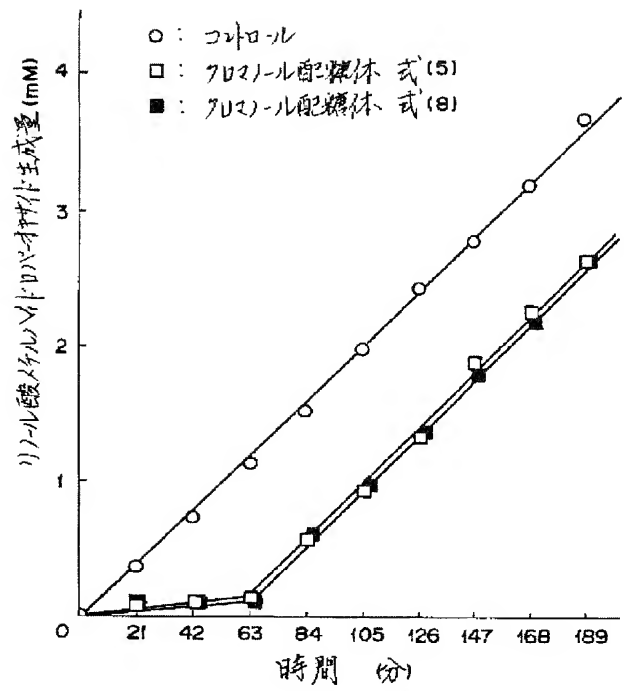
【図8】



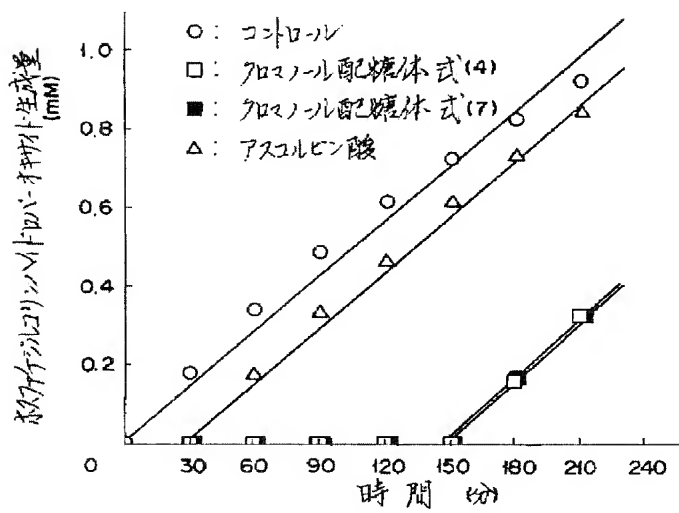
【図9】



【図10】



【図11】



【図12】

